魚介乾製品中の酸化防止剤分析法の検討と 妨害物質について

(昭和 59 年 11 月 22 日受理)

山本 政利^{*1} 越智寿美子^{*2} 小長井育子^{*2}
小峰 周一^{*2} 石川 雅章^{*2} 成田 弘子^{*1}
増井 俊夫^{*3} 北田 善三^{*3}

Studies on the Determination of Antioxidants in Dried Fishes, and Interfering Substances

Masatoshi YAMAMOTO^{*1}, Sumiko OCHI^{*2}, Ikuko KONAGAI^{*2}, Shuichi KOMINE^{*2},
Masaaki ISHIKAWA^{*1}, Hiroko NARITA^{*1}, Toshio MASUI^{*1} and
Yoshimi KITADA^{*3}

(*¹Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science:
4-27-2, Kita-ando, Shizuoka, Japan; *²Shimizu Health Center, Prefecture of
Shizuoka: 4-4-17, Tuji, Shimizu, Shizuoka, Japan; *³Nara Prefectural
Institute of Public Health: 57-6, Ohmori-cho, Nara, Japan)

Substances interfering with the determinations of dibutylhydroxytoluene (BHT) and butylhydroxyanisole (BHA) in dried fishes by gas chromatography (GC) were investigated. A substance which interfered with the determination of BHT by GC on DC-200 column was identified as *n*-pentadecane by comparing its retention time and mass spectrum with those of an authentic sample.

On SE-30, OV-17, DC-200, etc., which are frequently used to analyze BHT and BHA, paraffinic hydrocarbons (*n*-pentadecane, *n*-heptadecane, pristane) originating from fish interfere with the determination. The most suitable liquid phase for determination of BHT and BHA in dried fishes was OV-330. However, several columns of different characteristics can be used simply for identification of BHT and BHA by GC.

BHT added to packing materials as a stabilizer apparently soaked into dried fishes, and this may account for a small amount of BHT found in the fish.

(Received November 22, 1984)

Key words: ジブチルヒドロキシトルエン dibutyl hydroxy toluene (BHT); ブチルヒドロキシアニソール butyl hydroxy anisole (BHA); 魚介乾製品 dried fishes; ガスクロマトグラフィー (FID) gas chromatography (FID); *n*-ペンタデカン *n*-pentadecane; パラフィン系炭化水素 paraffinic hydrocarbons; 包装材料 packing materials

はじめに

煮干など魚介乾製品の原料であるイワシには、現在注目を集めているエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン

酸をはじめとする多価不飽和脂肪酸が多く含まれているが、これらは空気により酸化されて毒性のある過酸化脂質や変敗臭の原因となるアルデヒド類を生じやすい。そこで、酸化防止剤であるジブチルヒドロキシトルエン (BHT) やブチルヒドロキシアニソール (BHA) を添加し酸化を抑制している。ところが、最近 BHA に発ガン

*1 静岡県衛生環境センター：静岡市北安東 4-27-2

*2 静岡県清水保健所：静岡県清水市辻 4-4-17

*3 奈良県衛生研究所：奈良市大森町 57-6

性の疑いが持たれたため¹⁾, 酸化防止剤に対する社会的関心が一層高まってきた. こうしたことより魚介乾製品をはじめとする食品中の BHT, BHA を分析する機会が増加している.

食品中の BHT, BHA の分析には前処理及び分離分析の2つの操作が必要であるが, 先ず前処理法としては主にペンタンやヘキサンで抽出した後アセトニトリル分配する方法^{2)~4)}, 精油定量器で蒸留し捕集する方法^{5), 6)}が用いられ, 分離分析の方法としては薄層クロマトグラフィー^{3), 7)}, ガスクロマトグラフィー (GC)^{3), 5), 6), 8)}及び高速液体クロマトグラフィー^{4), 9)}による方法がそれぞれ報告されているが, 一般的には簡便にできる GC が採用されている.

今回, 魚介乾製品を精油定量器で蒸留捕集した後 GC で分析したところ, BHT の検出を妨害する物質の存在が認められたのでこれについて検討した.

また, 酸化防止剤を使用していない製品より微量の BHT が検出されたので調査したところ, これは包装材料からのものであったのでこのことについても併せて報告する.

実験方法

1. 試料

煮干, たたみいわしなどの魚介乾製品を用いた.

2. 試薬

BHT, BHA 及びフルオレンは東京化成工業(株)製を用いた.

n-テトラデカン (*n*-C₁₄), *n*-ペンタデカン (*n*-C₁₅), *n*-ヘキサデカン (*n*-C₁₆), *n*-ヘプタデカン (*n*-C₁₇), *n*-オクタデカン (*n*-C₁₈), *n*-ノナデカン (*n*-C₁₉) 及び *n*-エイコサン (*n*-C₂₀) はガスクロ工業(株)製を, また, プリスタン (*i*-C₁₉) は和光純薬工業(株)製を用いた.

充てん剤は担体の Chromosorb W (AW-DMCS, 60~80 mesh) に 20% DC-200, 5% SE-30, 2% OV-1, 5% OV-17, 5% XE-60, 5% PEG-20 M, 5% Thermon 1000+0.5% H₃PO₄ の液相をコーティングしたもの及び担体の Uniport HP (60~80 mesh) に 2% OV-330 の液相をコーティングしたものをそれぞれ用いた.

その他の試薬は特級品をそれぞれ用いた.

3. 装置

ガスクロマトグラフ: (株)日立製作所製, GC-163 形 (FID 検出器付)

ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC/MS): (株)日立製作所製, M-003 形データ処理装置付 M-80 A 形 GC/MS

精油定量装置: 日本薬局方規定品¹⁰⁾

マントルヒーター: 大科電器(株)製, AF-R 05 型

4. 実験操作

1) ガスクロマトグラフの操作条件

GC の条件は Fig. 1 に示した.

Fig. 1. Gas chromatograms of standard solution and dried sardine extract on 20% DC-200

(A): standard solution; (B): dried sardine extract

1: BHA, 2: BHT, 3: fluoren (internal standard), 4: *i*-C₁₉

Operating conditions: column, 20% DC-200 on Chromosorb W (AW-DMCS, 60-80 mesh) 3 mm i.d.×2 m glass tube; column temp., 160°C; carrier gas, N₂ 60 ml/min

2) GC/MS の操作条件

カラム: 内径 3 mm, 長さ 2 m, ガラス製, 2% OV-17 Chromosorb W (AW-DMCS, 80~100 mesh)

温度: 注入口 230°, 恒温槽 130°~200° まで毎分 5° で昇温, セパレーター 250°, イオン源 180°

イオン化電圧: 20 eV

キャリアーガス: He, 40 ml/min

3) 試験溶液の調製

静岡県食品標準試験法¹¹⁾に従った. すなわち, 試料 5 g を 500 ml ナス形フラスコに精秤し, 塩化ナトリウム 50 g, 水 200 ml 及び沸とう石を加え精油定量装置に付ける. 捕集液として 50 ppm フルオレン (内部標準物質) を含む酢酸 *n*-ブチル溶液 5 ml を加え冷却器を付けた後, マントルヒーターで加熱し沸とう後 4 時間蒸留する. 冷後, 酢酸 *n*-ブチル層を分取し無水硫酸ナトリウムで脱水し, GC 又は GC/MS の試験溶液とする.

結果及び考察

1. 妨害物質の検討

マイワシなどを原料とした魚介乾製品を充てん剤 DC-200 で分析したところ, ほとんどの試料より BHT と同じ保持時間にピークが認められ (Fig. 1), これを BHT に換算するとその濃度は痕跡から 0.022 g/kg に相当した. しかし, これらを極性の比較的大きな充てん剤 OV-330 で分析すると BHT の保持時間にはピークは認められなかった (Fig. 2). そこで充てん剤 DC-200

Fig. 2. Gas chromatograms of standard solution and dried sardine extract on 2% OV-330

(A): standard solution; (B): dried sardine extract

1: BHA, 2: BHT, 3: fluoren, 4: i -C₁₉

Operating conditions: column, 2% OV-330 on Uniport HP (60-80 mesh) 3 mm i.d. $\times$ 2 m glass tube; column temp., 130°C; carrier gas, N₂ 60 ml/min

での分析時 BHT の検出を妨害する物質について GC/MS で検討したところ, Fig. 3 に示すマススペクトルが得られ, この物質は分子イオン m/z 212 を持ち, またそのフラグメンテーションは直鎖系炭化水素に特有なもので n -C₁₅ と推定された. さらに保持時間及びマススペクトルが n -C₁₅ の標品と一致したので, この妨害物質を n -C₁₅ と同定した.

この n -C₁₅ は n -C₁₇, i -C₁₉ などの炭化水素とともにマイワシ, カタクチイワシ, アユなどの魚介類に存在することが報告されているが^{12),13)}, これらは石油類の海洋汚染による影響¹³⁾とも, プラクトンにより生合成されたものが魚介類に生物濃縮されたもの¹²⁾とも考えられている.

2. 各種充てん剤における保持時間の比較

魚介乾製品中の酸化防止剤の分析に充てん剤として SE-30 や OV-17 を用いたとき, n -C₁₇ 及び i -C₁₉ が BHA の検出を妨害することが知られている*⁴. 今回, イワシ, サバ, サンマなどの魚介類に含有される n -C₁₄~ n -C₂₀ の直鎖系炭化水素及び i -C₁₉ の分枝炭化水素並びに BHT, BHA の各種充てん剤における保持時間を求め, 妨害の有無について検討した. その結果を Table 1 に示したが, 極性の小さなメチルシリコン系充てん剤 SE-30, OV-1, DC-200 では BHA, BHT の順に溶出し, これらの保持時間は近似していた. しかし, フェニルシリコン系の OV-17 よりも極性の大きな充てん剤では逆

Fig. 3. EI mass spectra of n -C₁₅ standard and unknown

(A): n -C₁₅ standard; (B): unknown in Fig. 1 & 2.

Operating conditions: column, 2% OV-17 on Chromosorb W (AW-DMCS, 80-100 mesh) 3 mm i.d. $\times$ 2 m glass tube; column temp., prog. 130-200°C 5°C/min; separator temp., 250°C; ionization voltage; 20 eV; accelerating voltage, 3 kV

*⁴ 三輪良雄, 大村正美, 門名嘉則, 島津守矢, 平野多聞, 西村顕治, 佐藤英二: 日本食品衛生学会第 39 回学術講演会要旨集 p. 37 (1980).

Table 1. Relative Retention Time^{a)} of BHT, BHA and Hydrocarbons by Gas Chromatography on Various Columns

Column ^{b)} (Col. temp.)	Compound									
	BHT	BHA	<i>n</i> -C ₁₄	<i>n</i> -C ₁₅	<i>n</i> -C ₁₆	<i>n</i> -C ₁₇	<i>n</i> -C ₁₈	<i>n</i> -C ₁₉	<i>n</i> -C ₂₀	<i>i</i> -C ₁₉
5% SE-30 (130°C)	1.00 (5.55) ^{c)}	0.85	0.63	1.05	1.77	2.97	4.99	8.36	14.1	3.08
2% OV-1 (145°C)	1.00 (5.00)	0.85	0.64	1.04	1.68	2.70	4.36	7.04	11.3	2.86
20% DC-200 (160°C)	1.00 (6.40)	0.81	0.63	1.00	1.57	2.47	3.86	6.03	9.41	2.95
5% OV-17 (145°C)	1.00 (8.84)	1.19	0.29	0.49	0.79	1.30	2.14	3.47	5.69	1.21
5% XE-60 (140°C)	1.00 (3.20)	3.91	0.23	0.38	0.62	0.94	1.50	2.38	3.72	0.93
2% OV-330 (130°C)	1.00 (3.90)	6.38	0.14	0.25	0.44	0.76	1.31	2.27	3.95	0.70
5% PEG-20M (160°C)	1.00 (2.42)	10.1	0.25	0.38	0.47	0.81	1.23	1.83	2.69	0.69
Thermon 1000+ H ₃ PO ₄ (5+0.5%) (155°C)	1.00 (4.72)	11.1	0.13	0.19	0.30	0.44	0.68	1.03	1.56	0.40

^{a)} Retention time, relative to BHT^{b)} Column: glass tube, 3 mm i.d. × 2 m^{c)} Retention time**Table 2.** Hydrocarbons Interfering with Determination of BHT and BHA by Gas Chromatography on Various Liquid Phases

Liquid phase	Interfering hydrocarbon	
	BHT	BHA
SE-30, OV-1, DC-200	<i>n</i> -C ₁₅	—
PEG-20M, Thermon 1000+H ₃ PO ₄	<i>n</i> -C ₁₉	—
OV-17	—	<i>n</i> -C ₁₇ , <i>i</i> -C ₁₉
XE-60	<i>n</i> -C ₁₇ , <i>i</i> -C ₁₉	<i>n</i> -C ₂₀

に BHT, BHA の順に溶出し、極性に比例してそれらの保持時間の差も大きくなり、PEG-20 M では約 10 倍も異なった。

各充てん剤における BHT, BHA を妨害する炭化水素について一括して Table 2 に示したが、SE-30, OV-1, DC-200 では *n*-C₁₅ が BHT を、OV-17 では *n*-C₁₇ 及び *i*-C₁₉ が BHA を、XE-60 では *n*-C₁₇ 及び *i*-C₁₉ が BHT を、また *n*-C₂₀ が BHA を、さらに極性の比較的大きな Thermon 1000+H₃PO₄ では *n*-C₁₉ が BHT を、それぞれ妨害又はその恐れのあることが明らかとなった。また、内部標準物質であるフルオレンは OV-17 で *n*-C₁₈ により妨害を受けた。しかし、OV-330 及び PEG-20 M においては今回の検討条件でこれらの炭化水素の妨害を受けることなく分析が可能であった。この

うち OV-330 においては両者の保持時間が極端に異ならず、本分析に最も適した充てん剤と考えられた。

分析機器や分析技術の発達に伴い、酸化防止剤に限らず食品中の食品添加物を有効量の 1/10 以下の低濃度まで測定する傾向にあるため食品由来の夾雑物の妨害を受けやすく、これらの同定には慎重さが要求される。この同定には GC/MS を用いれば良いが、装置が高価なため一般的には極性の異なった 2 種以上の充てん剤を用いて GC の保持時間の一致により確認していることが多い。そのためにも、今回の検討で良好な結果の得られた OV-330 と PEG-20 M の使用は有効である。

3. 包装材料からの移行

密封包装された魚介乾製品より BHT が使用制限量の 1/10 程度検出される事例がいくつか生じたが、これらの製品には BHT の使用された事実はなかった。そこでこの原因について調査したところ、夏季の製造包装後 2 週間経過した市販品では 0.016 g/kg が検出された。また製造時に検出されない製品を実験的に密封包装し、暗室内 20°, 2 週間保蔵したところ約 0.005 g/kg の BHT を検出した。これより、魚介乾製品から検出された BHT は、包装材料に由来したことが明らかとなった。なお、実験には市販製品と同じ包装材料を用いた。すなわち、内側に無延伸フィルム (CPP)、外側に二軸延伸フィルム (OPP) を用いたポリプロピレンの複合フィルムであった。このフィルムには安定剤として BHT が添加

されており、この BHT が昇華性を有することもあり、食用油脂への溶出移行¹⁴⁾と同様に製品へ移行したものと考えられる。

魚介乾製品には主に BHA が使用されるが、今回のような低濃度の BHT の検出事例は食品へ添加されたものでなく、包装材料より移行したものと考えられ、衛生行政上の慎重な判断が要求される。

ま と め

魚介乾製品中の BHT, BHA の GC による分析時にこれらの検出を妨害する物質について及び低濃度検出される BHT の由来について検討した。

1) 充てん剤 DC-200 において BHT の検出を妨害する物質は試料に由来する $n\text{-C}_{15}$ であった。

2) OV-330 は魚介類中の炭化水素の妨害を受けにくく最も適した充てん剤であった。しかし、汎用される充てん剤 SE-30, OV-17 などにおいて $n\text{-C}_{15}$ の他、 $n\text{-C}_{17}$ 及び $i\text{-C}_{19}$ などの炭化水素が BHT 又は BHA の検出を妨害した。

3) 包装材料の安定剤として添加された BHT が魚介乾製品に移行することが明らかとなった。

謝 辞

本研究にあたり有益な御意見をいただきました浜松市保健所大村正美氏、横浜市衛生研究所桐ヶ谷忠司氏に深謝致します。

文 献

- 1) 藤井正美: 衛生化学 **29**, 111~116 (1983).
- 2) 厚生省環境衛生局食品化学課編: “食品中の食品添加物分析法” p. 221~226, p. 254~256 (1982)

講談社.

- 3) 中里光男, 冠 政光, 有賀孝成, 藤沼賢二, 直井家壽太: 食衛誌. **14**, 357~363 (1980).
- 4) Page, B. D.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62**, 1239~1246 (1979).
- 5) 成田弘子, 向後勝成, 木村庄治: 静岡県衛生研究所報告 **19**, 55~57 (1976).
- 6) 丸山武紀, 村上千秋, 兼松 弘, 新谷 勲, 今村正男: 食衛誌. **18**, 283~289 (1977).
- 7) Van Peteghem C. H., Dekeyser D. A.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **64**, 1331~1335 (1981).
- 8) Singh J., Lapointe: *ibid.*, **57**, 804~805 (1974).
- 9) Archer A. W.: *Analytica Chimica Acta*. **128**, 235~237 (1981).
- 10) 厚生省: 第十改正日本薬局方, p. 697~700 (1981).
- 11) 静岡県衛生研究所編: “静岡県食品標準試験法” p. 20~23 (1982).
- 12) 佐藤英二, 大村正美, 三輪良雄, 門名嘉則, 島津守矢, 魚谷逸朗, 西村顕治: 衛生化学 **27**, 218~223 (1981).
- 13) 中西多恵, 斉藤行生, 武田明治, 内山 充: 食衛誌. **18**, 182~190 (1977).
- 14) 厚生省環境衛生局食品化学課編: “食品用プラスチック衛生学” p. 120~121, p. 133~135 (1980) 講談社.